

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-184670

(43) 公開日 平成7年(1995)7月25日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/40		8114-4B		
A 6 1 K 31/215	ADN	9454-4C		
C 1 2 P 17/06		7432-4B		
// (C 1 2 P 7/40				
C 1 2 R 1:465)				

審査請求 未請求 請求項の数20 OL (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-256548

(22) 出願日 平成6年(1994)10月21日

(31) 優先権主張番号 1 4 1 3 1 6

(32) 優先日 1993年10月22日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 391015708

ブリistol-マイヤーズ スクイブ カン  
パニー

BRISTOL-MYERS SQUIB  
B COMPANY

アメリカ合衆国ニューヨーク州 10154

ニューヨーク パーク アベニュー 345

(72) 発明者 プライアン・エル・デイビス

アメリカ合衆国ニュージャージー州ミルタ  
ウン、メアリー・コート4番

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HMG-CoAリダクターゼ抑制剤およびその中間体の酵素ヒドロキシ化製造法

(57) 【要約】

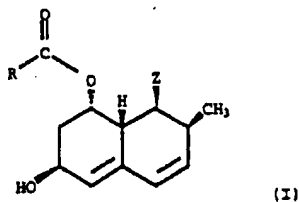
【目的】 本発明は、HMG-CoAリダクターゼ抑制剤としておよび/またはHMG-CoAリダクターゼ抑制剤の製造の中間体として有用な化合物の酵素ヒドロキシ化製造法を提供する。

【構成】 本発明の酵素ヒドロキシ化製造法は、ヒドロキシ化法を触媒しうる微生物、または該微生物から誘導される酵素あるいは該酵素の構造を有する酵素を用いることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

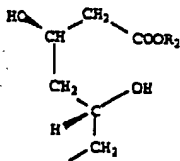
【請求項1】 式:

【化1】



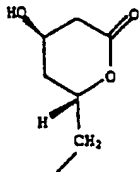
(式中、Rはアルキルまたはアリアル; Zは式:

【化2】



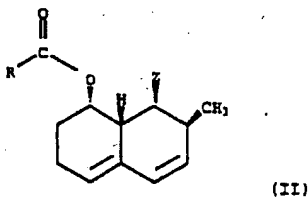
の開鎖成分基または式:

【化3】



のラクトン基;およびR<sub>2</sub>は水素、アルキル、アンモニウム、アルキルアンモニウムまたはアルカリ金属である)の化合物(I)またはその部分もしくは完全水素化類縁体あるいは塩の製造法であって、式:

【化4】



(式中、R、ZおよびR<sub>2</sub>は式Iの場合と同意義である)の化合物(II)またはその部分もしくは完全水素化類縁体あるいは塩を、該化合物(II)またはその塩のヒドロキシル化を触媒して、上記化合物(I)またはその塩を形成しうる微生物と、または該微生物から誘導される酵素あるいは該酵素の構造を有する酵素と接触せしめ、次いでヒドロキシル化を行う工程から成り、上記微生物はノカルジア属、アミコラータ属、サッカロポリスボラ属、ストレプトミセス属、アミコラトプシス属、サッカロシリックス属またはジルベールテラ属から選ばれ、但し、化合物(II)がコンパクチンのとき、微生物はアミコラータ属、ノカルジア属またはストレプト

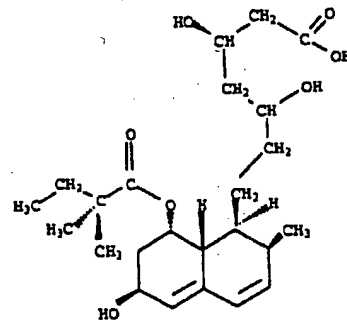
ミセス属でないことを特徴とする製造法。

【請求項2】 Zが開鎖成分基である請求項1に記載の製造法。

【請求項3】 Rがアルキルである請求項2に記載の製造法。

【請求項4】 式:

【化5】



10

20

30

40

50

の化合物またはその部分もしくは完全水素化類縁体あるいはアルカリ金属塩を製造する請求項1に記載の製造法。

【請求項5】 化合物(II)を微生物と接触せしめる請求項1に記載の製造法。

【請求項6】 微生物が、アミコラータ・オートトロフィカATCC35204、ストレプトミセス・カリホルニカスATCC15436、アミコラトプシス・メディターラネイATCC21411、サッカロシリックス・オストラリエンシスATCC31497、ジルベールテラ・ベルシカリアATCC38591、サッカロポリスボラ・ヒルスタATCC27875、サッカロポリスボラ・ヒルスタATCC27876、サッカロポリスボラ・ヒルスタATCC20501またはサッカロポリスボラ・エリスラATCC11635である請求項5に記載の製造法。

【請求項7】 微生物が、アミコラータ・オートトロフィカATCC35204またはサッカロポリスボラ・ヒルスタATCC20501である請求項6に記載の製造法。

【請求項8】 化合物(II)を水またはアルコールに溶解した後、微生物または酵素と接触せしめる請求項1に記載の製造法。

【請求項9】 化合物(II)と微生物または酵素との接触工程を、水性培地中で行う請求項1に記載の製造法。

【請求項10】 水性培地1ml当りに約0.5~3mgの化合物(II)を含ませる請求項9に記載の製造法。

【請求項11】 水性培地のpHが約6.0~7.5である請求項9に記載の製造法。

【請求項12】 水性培地の温度が約27~40℃である請求項9に記載の製造法。

【請求項13】 水性培地の温度が約28~34℃であ

る請求項12に記載の製造法。

【請求項14】 化合物(II)と微生物または酵素との接触工程を、約2.5～72時間続行する請求項1に記載の製造法。

【請求項15】 Zがラクトン基である請求項1に記載の製造法。

【請求項16】 化合物(II)を微生物または酵素と接触せしめる前に、加水分解しておく請求項15に記載の製造法。

【請求項17】 化合物(I)をHMG-CoAリダクターゼ抑制剤の製造に用いる請求項1に記載の製造法。

【請求項18】 請求項1に記載の方法に従って、化合物(II)またはその塩をヒドロキシル化して、化合物(I)またはその塩を得る工程から成ることを特徴とするHMG-CoAリダクターゼ抑制剤の製造法。

【請求項19】 請求項1に記載の方法に従って製造した化合物から成ることを特徴とする血漿コレステロール量の低下または維持用組成物。

【請求項20】 請求項1に記載の方法に従って製造した化合物から成ることを特徴とするアテローム硬化症の治療用組成物。

【発明の詳細な説明】

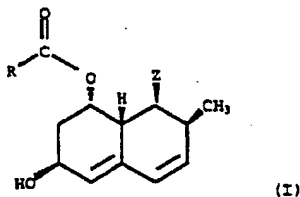
【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はHMG-CoAリダクターゼ抑制剤およびその中間体の酵素ヒドロキシル化製造法、更に詳しくは、HMG-CoAリダクターゼ抑制剤としておよび/またはHMG-CoAリダクターゼ抑制の製造の中間体として有用な化合物の酵素ヒドロキシル化法による製造法に関する。

【0002】

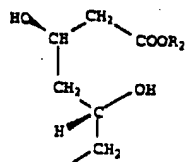
【発明の構成と効果】 本発明は、式：

【化6】



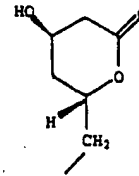
(式中、Rはアルキルまたはアリール；Zは式：

【化7】



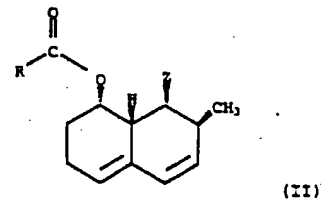
の開鎖成分基または式：

【化8】



のラクトン基；およびR<sub>2</sub>は水素、アルキル、アンモニウム、アルキルアンモニウムまたはアルカリ金属である)の化合物(I)またはその部分もしくは完全水素化類縁体あるいは塩の製造法であって、式：

【化9】



(式中、R、ZおよびR<sub>2</sub>は上記式Iの場合と同意義である)の化合物(II)またはその部分もしくは完全水素化類縁体あるいは塩を、該化合物(II)またはその塩のヒドロキシル化を触媒して、上記化合物(I)またはその塩を形成しうる微生物と、または該微生物から誘導される酵素あるいは該酵素の構造を有する酵素と接触せしめ、次いでヒドロキシル化を行う工程から成り、上記微生物はノカルジア(Nocardia)属、アミコラータ(Amycolata)属、サッカロポリスボラ(Saccharopolyspora)属、ストレプトミセス(Streptomyces)属、アミコラトプシス(Amycolatopsis)属、サッカロリックス(Saccharotrix)属またはジルベルテラ(Gilbertella)属から選ばれ、但し、化合物(II)がコンパクチン(compactin)のとき、微生物はアミコラータ属、ノカルジア属またはストレプトミセス属でないことを特徴とする製造法を提供するものである。

【0003】 本発明の酵素ヒドロキシル化法(製造法)は、それ自体がHMG-CoAリダクターゼ抑制活性を呈しうる、および/または他のHMG-CoAリダクターゼ抑制剤の製造の中間体として使用しうる、化合物(I)を得る有効な手段を付与する。すなわち、本発明のヒドロキシル化法を採用することにより、副生物の減少または排除が達成され、またこのヒドロキシル化法は、穏やかな反応条件下で行うことができる。以下、本発明方法について詳述する。

【0004】 定義

本明細書において、単独または他の基の一部として用いる各種語句の定義は、以下の通りである。「酵素法」とは、酵素または微生物を用いる方法を意味する。「アルキル」とは、ノルマル鎖の炭素数1～12、好ましくは1～6の、必要に応じて置換された直鎖および分枝炭化水素基の両方を意味し、たとえばメチル、エチル、ブ

ロピル、イソプロピル、ブチル、t-ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、これらの各種分枝鎖異性体等が挙げられる。置換基の具体例としては、ハロ(特にクロロ)、トリハロメチル、アルコキシ(たとえば2つのアルコキシ置換基がアセタールを形成する場合)、非置換アリール(たとえばフェニル)、アルキル-アリールまたはハロアリールなどのアリール、非置換シクロアルキルまたはアルキル-シクロアルキルなどのシクロアルキル、ヒドロキシまたは保護されたヒドロキシ、カルボキシル、アルキルオキシカルボニル、アルキルアミノ、ジメチルアミノなどのジアルキルアミノ、アセチルアミノなどのアルキルカルボニルアミノ、アミノ、アリールカルボニルアミノ、ニトロ、シアノ、チオール、およびアルキルチオの群から選ばれる少なくとも1つの基が含まれる。好ましいアルキルの置換基は、ヒドロキシ基である。

【0005】「アルケニル」とは、アルキルの場合に上述した、必要に応じて置換された直鎖または分枝鎖炭化水素基であって、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有するものを意味する。「シクロアルキル」とは、好ましくは1~3つの環およびホモ環式環1つ当り3~12、好ましくは3~8つの炭素を有する、必要に応じて置換された飽和ホモ環式炭素環系を意味し、たとえばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロデシル、シクロドデシル、およびアダマンチルが挙げられる。任意の置換基の具体例としては、上記アルキルの少なくとも1つ、またはアルキルの置換基で上述した基の少なくとも1つが含まれる。

【0006】「アリール」とは、環部の炭素数6~12のモノ環式またはジ環式置換または非置換芳香族基を意味し、たとえばフェニル、ピフェニル、ナフチル、置換フェニル、置換ピフェニルまたは置換ナフチルが挙げられる。置換基(好ましくは3つもしくはそれ以下)の具体例としては、非置換アルキル、ハロアルキルまたはシクロアルキルアルキルなどのアルキル、ハロゲン、非置換アルコキシまたはハロアルコキシなどのアルコキシ、ヒドロキシ、フェニルまたはハロフェニルなどのアリール、フェノキシなどのアリールオキシ、アルキルカルボニルオキシまたはアロイルオキシ、アリル、アルキルアミ

ノ、ジアルキルアミノ、アルキルカルボニルアミノまたはアリールカルボニルアミノなどのアミド、アミノ、ニトロ、シアノ、アルケニル、チオール、アルキルカルボニルまたはアリールカルボニル、またはメチレンジオキシ(ここで、メチレン基は低級アルキル基、すなわち、上述の炭素数1~6のアルキル基、アリールアルケニル基および/またはアルキルチオ基で置換されていてもよい)の群から選ばれる少なくとも1つの基が含まれる。

10 【0007】「ハロ」または「ハロゲン」とは、塩素、フッ素、臭素または沃素を意味する。「塩」とは、酸性塩および/または無機および/または有機塩基によって形成される塩基性塩を指称する。非毒性の医薬的に許容しうる塩が好ましい。医薬的に許容しうる塩の具体例としては、ナトリウム、カリウム、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、亜鉛およびテトラメチルアンモニウムなどのカチオンから形成される塩並びにアンモニア、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リシン、アルギニン、オルニチン(ornitine)、コリン、  
20 N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、ジエタノールアミン、プロカイン、N-ベンジルフェネチルアミン、1-p-クロロベンジル-2-ピロリジン-1'-イール-メチルベンズイミダゾール、ジエチルアミン、ピペラジンおよびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンなどのアミンから形成される塩が含まれる。

【0008】「医薬的に許容しうるカチオン」とは、たとえば上述の、医薬的に許容しうる塩を形成する陽カウンターイオンを意味する。「ATCC」とは、微生物寄託所の、メリーランド州20852、ロックビル、パークラウン・ドライブ12301のザ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(the American Type Culture Collection)の受入番号を指称する。

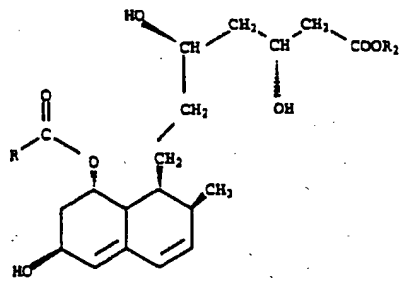
#### 【0009】出発物質

本発明のヒドロキシル化法で使用すべき化合物(II)は、当業者に公知の方法によって得ることができる。かかる化合物(II)は、たとえばU.S.特許No. 4450171に開示されている。

#### 【0010】好ましい化合物

40 下記式 Ia を有する化合物(I)またはその部分もしくは完全水素化類似体あるいはアルカリ金属塩が好ましい。

【化10】

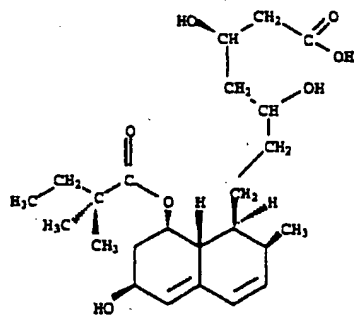


(Ia)

(式中、RはアルキルおよびR<sub>2</sub>は式Iの記載と同意義である)

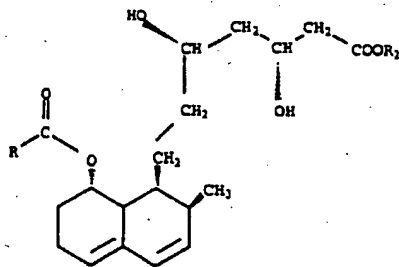
特に好ましい具体例は、式:

【化11】



20

\*

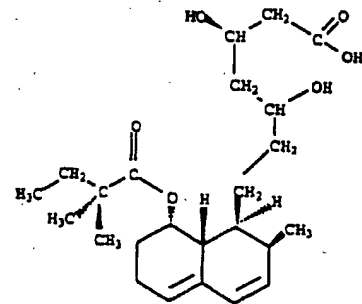


(IIa)

(式中、RはアルキルおよびR<sub>2</sub>は式IIの記載と同意義である)

特に好ましい具体例は、式:

【化13】



40

のメチルコンパクチンまたはその部分もしくは完全水素化類縁体あるいはアルカリ金属塩である。

50 【0012】二重結合が存在しない、化合物(I)、また

は本明細書に記載のいずれの化合物も、かかる二重結合が存在する対応化合物を、当業者に公知の方法に従って水素化することによって得ることができる。本発明方法のいずれの生成物も、公知の方法、たとえば細胞または細胞性物質の濾去により、適当な場合には、抽出、結晶化、薄層またはカラムクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー等によって単離および精製しうる。

【0013】本明細書において、上記メチルコンバクテンおよびメチルブラバスタチンで示される構造を、これらの化合物の酸型と称す。これらの化合物のカルボキシル基がアルカリ金属塩の形状にある場合、該化合物を塩型と称す。以下で説明するように、本発明のヒドロキシル化法を行うのに水性媒体の使用が好ましい。従って、Zが上述の開鎖成分基である化合物を製造したり、あるいは出発物質として用いることが好ましい。何故なら、かかる化合物は、Zがラクトン基である対応化合物より水溶性が比較的に大きいためである。Zがラクトン基である化合物(II)は、たとえば、本発明方法での使用に先立ち、加水分解することによって開鎖型にすることができる。

#### 【0014】酵素および微生物

本発明方法で用いる酵素または微生物は、起源または純度に拘らず、上述の変換を触媒する能力を有するものであれば、いずれの酵素または微生物であってもよい。触媒酵素の源として適当な微生物の属としては、ノカルジア、アミコラータ、サッカロポリスポラ、ストレプトミセス、アミコラトプシス、サッカロシリックスまたはジルベールテラが含まれる。本発明の使用に好適な具体種としては、アミコラータ・オートトロフィカ(*Amycolata autotrophica*) (たとえばATCC35204)、ストレプトミセス・カリホルニカス(*Streptomyces californicus*) (たとえばATCC15436)、アミコラトプシス・メディタラネイ(*Amycolatopsis mediterranei*) (たとえばATCC21411)、サッカロシリックス・オストラリエンシス(*Saccharothrix australensis*) (たとえばATCC31497)、ジルベールテラ・ベルシカリア(*Gilbertella persicaria*) (たとえばATCC38591)、サッカロポリスポラ・ヒルスタ(*Saccharopolyspora hirsuta*) (たとえばATCC27875、27876または20501)、サッカロポリスポラ・エリスラ(*Saccharopolyspora erythraea*) (たとえばATCC11635)等が挙げられる。特に好ましいのは、アミコラータ・オートトロフィカ(たとえばATCC35204)およびサッカロポリスポラ・ヒルスタ(たとえばATCC20501)である。

【0015】微生物の使用に関し、上述の変換を触媒する能力を有するいずれの微生物細胞性物質をも使用して、本発明方法を実施しうる。細胞は、元の状態の湿潤細胞、あるいは凍結乾燥、噴霧乾燥または加熱乾燥などによる乾燥細胞の状態で使用しうる。また細胞は、破壊

細胞または細胞抽出物などの処理細胞物質の状態でも使用しうる。細胞または細胞性物質、たとえば単離真菌菌糸体は、フリー状態で、または物理的吸着あるいは閉じ込めなどによって支持体に固定して使用することができる。本発明方法の実施に際し、少なくとも1種の微生物を使用しうる。

【0016】本発明方法は、使用する微生物の生長に続いて実施されてよく、たとえば出発物質である化合物(II)の存在下あるいは非存在下で微生物を生長させ、微生物物質を回収し、好ましくは洗浄し(たとえば水で)、次いで得られる微生物物質を出発物質である化合物(II)と接触せしめる。また本発明方法は、現場での発酵および反応によって、すなわち、活発に生長する微生物存在下の反応によっても実施することができる。反応は、静かな(静止)状態下、または攪拌を用いて行うことができる。出発物質の化合物(II)を活発に生長する培養物に加えるときは、フラスコ振盪培養あるいは通気攪拌などの攪拌の使用が好ましい。かかる場合に、消泡剤を使用しうる。

【0017】微生物の生長は、当業者によって、たとえば炭素および窒素源などの栄養素および微量元素を含有する適当な培地の使用によって達成される。同化しうる炭素源の具体例としては、グルコース、グリセロール、マルトース、デキストリン、スターチ、ラクトース、スクロース、糖蜜、大豆油、綿実油等が挙げられる。同化しうる窒素源の具体例としては、大豆ミール、ビーナッツミール、綿実ミール、魚ミール、コーン浸出液、ペプトン、米ぬか、肉エキス、酵母、酵母エキス、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等が挙げられる。かかる培地に、塩化ナトリウム、リン酸塩、炭酸カルシウムなどの無機塩を加えてもよい。また少量の金属塩または重金属を加えてもよい。

【0018】微生物の生長の種々の段階で、同一または異なる培地を使用しうる。微生物の生長に好ましい培地は、後記実施例に記載のもので、該培地は本発明方法で採用する微生物の生長に使用しうる。酵素を用いるとき、上述の微生物から誘導される酵素が好ましく、あるいは合成または他の方法で製造したものでもよい。たとえば、これらの酵素は遺伝子工学設計の宿主細胞から誘導しうる。遺伝子工学設計の宿主細胞自体、あるいは他の方法で変性された細胞の使用も意図されるが、この場合、かかる細胞は上記列挙した属の微生物から誘導される酵素の構造を有する酵素を産生しうるのが条件である。

#### 【0019】反応条件

本発明方法は、水性培地(たとえば緩衝水性培地)で行ってよい。水性相は便宜上、水、好ましくは脱イオン水、あるいは適当水性緩衝剤溶液、特にリン酸塩緩衝剤溶液である。本発明のヒドロキシル化法にあっては、水性培地の使用が好ましい。

【0020】また本発明での反応は、有機培地または有機培地と水性培地の混合物である培地で行ってもよい。有機または有機/水性培地の使用は、出発物質として水溶性の小さい化合物(ⅠⅠ)、たとえばZがラクトン基である化合物(ⅠⅠ)の可溶化を高めうる。水溶性の小さい出発物質は、たとえばメチルまたはエチルアルコールなどの有機溶剤に溶解し、該溶液を変換用の水性培地に加えることができる。かかる有機培地を形成する液体は水に不混和性であってよく、あるいは好ましくは、水に混合性のものであってよい。有機培地の具体例としては、トルエン、ヘキサン、ベンゼン、アセトン、ジメチルスルホキシド、シクロヘキサン、キシレン、トリクロロトリフルオロエタン、メチルもしくはエチルアルコールまたはブタノールなどのアルコール等が挙げられる。

【0021】出発物質は、反応培地に加えるに先立ち、たとえば水またはアルコールに溶解することが好ましい。反応培地は、液体培地1ml当り、約0.5~3mgの化合物(ⅠⅠ)(出発物質)を含有することが好ましい。反応培地のpHは、約6.0~7.5が好ましい。本発明のヒドロキシル化反応を実施するため、水または有機アルコール(たとえばメチルもしくはエチルアルコールなどのアルコール)を加えてもよい。これらの物質は、化合物(ⅠⅠ)(出発物質)に対してモル過剰、好ましくは多大モル過剰をもたらす量で使用するが好ましい。

【0022】本発明方法で微生物細胞を用いる場合、その添加量は、化合物(ⅠⅠ)(出発物質)1mg当り約10~1000mgの量が好ましい。本発明方法で酵素を用いる場合、その添加量は、化合物(ⅠⅠ)(出発物質)1mg当り約1~100mgの量が好ましい。反応培地は、約27~40℃の温度に保持することが好ましく、最も好ましくは、約28~34℃に保持する。反応時間は、微生物細胞によって産生される酵素の量、あるいは微生物細胞の使用量、およびその比活性に応じて、適当に変えることができる。反応時間の典型例は、約2.5~72時間である。なお、反応時間は、反応温度の上昇および/または反応溶液に加える酵素量の増大によって、縮小してもよい。

【0023】HMG-CoAリダクターゼ抑制剤の製造 HMG-CoAリダクターゼ(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素Aリダクターゼ、EC1.1.1.34)は、コレステロール生合成の基本酵素である。この酵素の抑制剤は、抗コレステロール血症剤として、すなわち、血漿コレステロール量の低下または維持の用途が認められる。HMG-CoAリダクターゼ抑制剤は、高コレステロール血症の治療や予防に加えて、アテローム硬化症、高リポタンパク血症、および/または高リポド血症の治療や予防の用途も認められる。

【0024】上記化合物(ⅠⅠ)は(たとえばメチルコン \*

培地

F7

培地組成

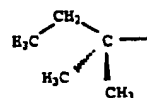
麦芽エキス10g/L、酵母エキス10g/L、ペプトン1g/L、

\*バクチン)それ自体、HMG-CoAリダクターゼ抑制活性を呈することができ、および/またはHMG-CoAリダクターゼ抑制活性を有する他の化合物の製造の中間体として使用しうる。後者の場合、本発明はさらに、上記本発明方法に従ってヒドロキシル化を行った後、形成されるヒドロキシル化生成物をHMG-CoAリダクターゼ抑制剤の製造に用いる(たとえば各種基を脱保護、付加または他の方法で変性する)方法から成る方法を提供する。好ましくは、このようにして製造した抑制剤は、その製造原料のヒドロキシル化生成物が有しうるようなHMG-CoAリダクターゼ抑制活性と比べて該活性が増大している。

【0025】本発明方法に従って得られるHMG-CoAリダクターゼ抑制剤は、たとえば、当業者にとって公知の方法に従い選ばれた方式および用量で、哺乳動物(特にヒト)に投与することができる。

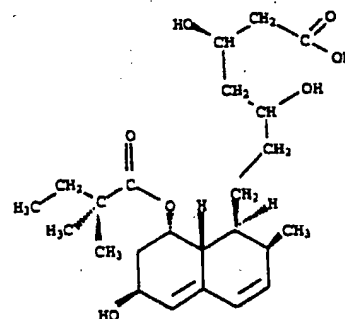
【0026】本発明のHMG-CoAリダクターゼ抑制剤の特に好ましい製造法は、(A)Rが

【化14】



およびR<sub>2</sub>がHである化合物(ⅠⅠa)、またはその塩を、アミコラータ・オートトロフィカ(ATCC35204)またはサッカロポリスボラ・ヒルスタの亜種コペンシス(kobensis)(ATCC20501)でヒドロキシル化して、式：

【化15】



の構造を有するメチルプラバスタチンまたはそのアルカリ金属(特にナトリウムまたはリチウム)塩を得ることから成る。

【0027】

【実施例】次に挙げる実施例は、本発明の好ましい具体例を示すが、特許請求の範囲に記載の技術的範囲または精神を限定するものではない。これらの実施例で用いる培地の成分は、以下の通りである。



- デキストロース 20g/L、全体を蒸留水で1L(オートクレーブによる滅菌処理の前にpH7.0に調整)
- K28 薬物培地(Pharmamedia) 25g/L、セロース 69g/L、CaCO<sub>3</sub> 9g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1g/L、全体を水道水で1L(オートクレーブによる滅菌処理の前にpH6.8~7.0に調整)
- F4 トリプトン 5g/L、麦芽エキス 3g/L、グルコース 10g/L、酵母エキス 3g/L、全体を蒸留水で1L(オートクレーブ中滅菌)
- F46 グリセロール 10g/L、マルトース 40g/L、トーストしたニヌトリゾイ(Nutrisoy)粉末 30g/L、ペプトン 10g/L、噴霧乾燥したコーン浸出液 10g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L、全体を水道水で1L(オートクレーブによる滅菌処理の前にpH5.3に調整)

[0028]

培地	培地組成
M124	セロース 10g/L、NZアミンB 15g/L、酵母エキス 10g/L、NaCl 5g/L、CaCO <sub>3</sub> 1g/L、全体を水道水で1L(オートクレーブによる滅菌処理の前にpH6.8~7.0に調整)
ブイヨン1 (注1)	ビーフィンフュージョン 300g/L、カザミノ酸、テクニカル 17.5g/L、スターチ 1.5g/L、全体を蒸留水または脱イオン水で1L(沸とう加熱して完全溶解、最終pH7.4)
ブイヨン2 (注2)	トリブチケース・ペプトン 17g/L、フィトン・ペプトン 3g/L、NaCl 5g/L、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.5g/L、デキストロース 2.5g/L、全体を蒸留水で1L(オートクレーブ中滅菌)
Y17	酵母窒素ベース 6.7g/L、グルコース 50g/L、シグマ(Sigma)アデニンHCl 0.09g/L、シグマ1-チロシン 0.06g/L、ディフコ(Difco)カザミノ酸 2g/L(沸とう加熱およびミックス)、寒天 20g/L、全体を蒸留水で1L(オートクレーブ中滅菌)

注1) ミューラー-ヒントン(Mueller-Hinton)ブイヨン(ディフコ商標)

注2) トリブチケースソイブイヨン(BBL商標)

## [0029] 実施例1

1本の凍結バイアルのアミコラータ・オートトロフィカ(ATCC35204)および1本の凍結バイアルのサッカロポリスボラ・ヒルスタ亜種コペンシス(ATCC20501)を解凍し、これらを別々のそれぞれ100mlのF4培地を含有する500mlフラスコへ接種するのに用いる。各フラスコを約280rpm、25℃の振盪器に設置し、72時間振盪する。72時間A.オートトロフィカ培養ブイヨンの各2.5mlアリコートを用い、50mlのF7培地含有の6つの250mlフラスコおよび50mlのK28培地含有の6つの250mlフラスコへ接種する。同様に、72時間S.ヒルスタ培養ブイヨンの各2.5mlアリコートを用い、50mlのF7培地含有の6つの250mlフラスコおよび50mlのK28培地含有の6つの250mlフラスコへ接種する。この結果、トータル24のフラスコが存在する。24全てのフラスコを振盪器に設置し、約280rpm、25℃で振盪する。24時間の振盪後、それぞれ培養した3つのF7フラスコおよび

3つのK28フラスコに、フィルター滅菌した5mg/mlのメチルコンパクチン塩溶液1mlを無菌的に加える。(塩溶液はラクトンから、該ラクトンを最小量のエタノールに溶解し、約15mlの水を加え[幾つかの沈澱物が生成]、pHを約11.8に調整し、沈澱物が溶解するまで65℃ウォーターバスで培養し、次いでpHを注意深く7.5まで降下せしめることによって製造する。蒸留水を加えて、計算濃度を5mg/mlに調整する。)この時点で、新しい2つのフラスコを追加し、各培地の非接種フラスコに塩を投入して、非生物学的変性の対照とする。以後、これらのフラスコに、接種したフラスコと同じ処理を行う。

[0030] 同様に、それぞれ培養した3つのF7フラスコおよび3つのK28フラスコに、滅菌500+μg/ml用量のコンパクチンを加える。新しい2つのフラスコを追加し、各培地の非接種フラスコに、コンパクチンを投入する。(接種コンパクチンフラスコの使用目的は、コンパクチンのヒドロキシル化が正常に起っていることを示す、陽性対照としての役目を果たすことである。非接種フラスコは、基質の可能性のある非生物学的変化のための対照として役立つ。)振盪をさらに24時間再

開する。次いで全てのフラスコに、前に投入したものと  
同じ2回目用量の塩を入れる。さらにまた振盪を24時  
間再開した後、それぞれ培地-基質組合せにつき1つを  
含む、8つのフラスコの培養物を回収する(時間T<sub>1</sub>に  
て)。回収フラスコのブイオンを、基質およびヒドロキ  
シル化生成物のアッセイに付す。さらに24時間の振盪\*

\*後、10メチルコンパクチン塩サンプルおよび10コン  
パクチンサンプルを含む、残った20のフラスコの培養  
物を回収する(時間T<sub>2</sub>にて)。これらのブイオンを適当  
な基質-生成物アッセイに付す。

【0031】結果を下記表1および2に示す。

【表1】

培養物	培地	コンパクチン (μg/g)			フラバスタチン (μg/g)		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
A. ナトリウム	F7	8.4	0	0	474	475	503
	K28	4.6	0	0	470	575	512
S. ヒスタ	F7	842	127	122	347	775	753
	K28	412	0	0	675	750	762
なし(対照)	F7	-	1857	-	-	0	-
	K28	-	1806	-	-	0	-

【表2】

培養物	培地	メチルコンパクチン (μg/g)			メチルフラバスタチン (μg/g)		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
A. ナトリウム	F7	0	0	0	57.9	56.4	55.4
	K28	0	0	0	59.8	62.4	66.7
S. ヒスタ	F7	1.7	0	0	71.5	77.1	82.9
	K28	3.1	0	0	58.9	63.3	63.8
なし(対照)	F7	-	96.5	-	-	0	-
	K28	-	90.2	-	-	0	-

#### 【0032】実施例2

1本の凍結バイアルのサッカロポリスボラ・ヒルスタ亜  
種コペンシス(ATCC20501)を解凍し、これを1  
00mlのF4培地を含有する500mlフラスコへ接種す  
るのに用いる。フラスコを約280rpm, 25℃の振盪  
器に設置し、72時間振盪する。72時間ブイオンのア  
リコートを用い、45mlのK28培地含有の2つの25  
0mlフラスコに接種する。2つのフラスコを振盪器に設  
置し、約280rpm, 25℃で振盪する。24時間の振  
盪後、メチルコンパクチン塩を水に溶解して溶液を得、  
これをフィルター滅菌する。この溶液の一部を、1つの  
K28フラスコに加える。6時間後、同フラスコに上記  
溶液の同量部を加える。第2K28フラスコにも、第3

非接種K28フラスコと同様に一部の溶液を入れる。3  
つ全てのフラスコを振盪器に設置し、振盪を18時間再  
開する。

【0033】次いで第1フラスコに、3回目用量を入れ  
る。6時間後、第1フラスコに4回目用量(最終)を入  
れ、第2フラスコに2回目用量(最終)を入れ、そして非  
接種フラスコに2回目用量(最終)を入れる。さらに42  
時間の振盪後、3つのフラスコの培養物を回収し、かか  
る全てのブイオンをメチルコンパクチンおよびメチルブ  
ラバスタチンのアッセイに付す。結果を下記表3に示  
す。

【表3】

サンプル	コンパクション (μg/g)	フラバクション (μg/g)
フラスコ 1	0	284.8
フラスコ 2	0	251.5
細胞なし対照	418.6	0

## 【0034】実施例3

それぞれ1本の凍結バイアルのアミコラータ・オートトロフィカ(ATCC35204)、ストレプトミセス・カリホルニカス(ATCC15436)、アミコラータ・ハイドロカーボンオキシダンス(*Amycolata hydrocarbonoxydans*)(ATCC15104)、アミコラトプシス・メディターラネイ(ATCC21411)、アミコラトプシス・ファスティディオサ(*Amycolatopsis fastidiosa*)(ATCC31181)およびサッカロポリスボラ・ヒルスタ亜種コペンシス(ATCC20501)を解凍し、これらを100mlのF7増地を含有する500ml発芽フラスコへ接種するのに用いる。全てのフラスコを約280 rpm, 25℃の振盪器に設置し、72時間振盪する。各発芽フラスコの10mlアリコートを用い、それぞれ1200mlのK28増地含有の別々のフラスコに接種する。次\*

\*いで、全てのフラスコを振盪器へ戻す。24時間後、各フラスコに500 μg/mlのフィルター滅菌したコンパクション(酸型)を加える。再度、フラスコを振盪器へ戻す。さらに24時間後、各フラスコから15mlアリコートを取り出し、後のアッセイのため凍結する(T<sub>1</sub>)。2回目500 μg/ml用量の滅菌酸型コンパクションを各フラスコに加え、該フラスコを振盪器へ戻す。その24時間後に、各フラスコから2回目の15mlアリコートを取り出し、後のアッセイのため凍結する(T<sub>2</sub>)。さらに24時間後、各フラスコから最終15mlアリコートを取り出し、後のアッセイのため凍結する(T<sub>3</sub>)。

【0035】全てのサンプルを解凍し、アッセイに付す。結果を下記表4~6に示す。

【表4】

培養物	T <sub>1</sub>		
	コンパクション	フラバクション	変換率
A. ハイドロカーボンオキシダンス	439	0	-
A. メディターラネイ	21	142	28%
A. ファスティディオサ	376	0	-
S. ヒルスタ	40	201	40%
対照:			
A. オートトロフィカ	68	110	22%
S. カリホルニカス	0	75	15%

【表5】

培養物	T <sub>2</sub>		
	コンパクション	フラバクション	変換率
A. ハイドロカーボンオキシダンス	767	0	-
A. メディターラネイ	15	282	28%
A. ファスティディオサ	181	0	-
S. ヒルスタ	19	399	40%
対照:			
A. オートトロフィカ	痕跡	293	29%
S. カリホルニカス	0	167	17%

【表6】

培養物	T <sub>1</sub>		
	コンバクチン	プラスチン	変換率
A. ハイロキ-エンシダス	812	0	-
A. テイラー	21	290	29%
A. フォステイター	711	0	-
S. ヒルスタ	痕跡	394	39%
対照:			
A. オートロフィカ	3	276	28%
S. アリコート	2	157	16%

## 【0036】実施例4

46時間培養のサッカロポリスボラ・ヒルスタ亜種コンシス(ATCC20501)(28℃で生長)およびアミコラータ・オートロフィカ(ATCC35204)(25℃で生長)を用い、各種培地のフラスコ(50ml培地/250mlフラスコ)に接種する。フラスコ1つに、5mlの接種物を用いる。以下の培地: F7、F46、K28、M124、ブイヨン1(ミューラー-ヒントン)、ブイヨン2[トリプチケースソイブイヨン(TSB)]または Y17のそれぞれを含有する2つの別々のフラスコに、S. ヒルスタを接種する。各培地の一方のフラスコを約280rpm, 25℃の振盪器に設置し、各培地の他方のフラスコを約280rpm, 28℃の振盪器に設置する。別途F7培地およびK28培地のそれぞれのフラスコに接種し、32℃のウォーターバス振盪器に置く。

【0037】それぞれF7培地およびK28培地の2つ

の別々のフラスコに、A. オートロフィカを接種する。各培地の一方の接種フラスコを約280rpm, 25℃の振盪器に設置し、各培地の他方の接種フラスコを約280rpm, 28℃の振盪器に設置する。24時間後、各フラスコに500μg/g用量のフィルター滅菌したコンバクチン(酸型)を加える。これらのフラスコを、同温度の振盪器へ戻す。さらに24時間後、各フラスコから10mlアリコートを取り出し、後のアッセイのため凍結する(T<sub>1</sub>)。各フラスコに、2回目の500μg/g用量の滅菌酸型コンバクチンを加え、これらのフラスコを再度、同温度の振盪器へ戻す。さらに48時間後、2回目の10mlアリコートを採取する(T<sub>2</sub>)。T<sub>1</sub>サンプルを解凍し、T<sub>2</sub>サンプルと共にアッセイに付す。結果を下記表7~9に示す。

【0038】

【表7】

S. LMS 培地/温度 (°C)	T <sub>1</sub> (凍結および解凍)		
	コンパチン	フラスカチン	変換率
F7/25°	432	40	8%
F7/28°	154	168	34%
F7/32°	450	43	9%
F46/25°	516	10	2%
F46/28°	494	17	3%
K28/25°	179	147	29%
K28/28°	105	184	37%
K28/32°	211	100	20%
M124/25°	180	139	28%
M124/28°	103	191	38%
ミューラー-ヒントン/25°	496	38	8%
ミューラー-ヒントン/28°	402	43	9%
TSB/25°	358	74	15%
TSB/28°	211	163	33%
Y17/25°	605	0	-
Y17/28°	533	0	-
A. オートロフィカ (対照) F7/25°	334	51	10%
A. オートロフィカ (対照) F7/28°	111	108	22%
A. オートロフィカ (対照) K28/25°	242	79	16%
A. オートロフィカ (対照) K28/28°	60	127	25%

【表 8】

S. 培養 培地/温度 (°C)	T <sub>2</sub> (凍結せず)		
	コンバット	フラバット	変換率
F7/25°	65	452	45%
F7/28°	痕跡	550	55%
F7/32°	痕跡	570	57%
F46/25°	965	0	-
F46/28°	999	0	-
K28/25°	0	405	41%
K28/28°	0	405	41%
K28/32°	5	288	29%
M124/25°	233	323	32%
M124/28°	286	303	30%
ムーラ--ヒトン/25°	827	121	12%
ムーラ--ヒトン/28°	716	81	8%
TSB/25°	465	238	24%
TSB/28°	363	289	29%
Y17/25°	1086	0	-
Y17/28°	881	0	-
A. 対トロイカ (対照) F7/25°	痕跡	256	27%
A. 対トロイカ (対照) F7/28°	0	220	22%
A. 対トロイカ K28/25°	2	256	27%
A. 対トロイカ (対照) K28/28°	痕跡	257	26%

【表9】

S. ヒルスタ 培地/温度 (°C)	T. フラスコ: 全ての他の 生成物の比
F7/25°	19.0 : 1
F7/28°	13.2 : 1
F7/32°	13.3 : 1
F46/25°	0.3 : 1
F46/28°	0.4 : 1
K28/25°	15.7 : 1
K28/28°	10.0 : 1
K28/32°	10.1 : 1
M124/25°	8.4 : 1
M124/28°	9.2 : 1
ミューラー-ヒントン/25°	3.9 : 1
ミューラー-ヒントン/28°	4.6 : 1
TSB/25°	4.8 : 1
TSB/28°	9.6 : 1
Y17/25°	-
Y17/28°	-
A. オートロフィ F7/25°	4.2 : 1
A. オートロフィ (対照) F7/28°	5.4 : 1
A. オートロフィ (対照) K28/25°	4.4 : 1
A. オートロフィ (対照) K28/28°	4.5 : 1

## 【0039】 実施例5

- 25℃のF4培地で生長した67時間培養の各種微生物を用い、これらを50mlのF7培地含有の250mlフラスコ、および50mlのK28培地含有の250mlフラスコに接種する。フラスコ1つに、5mlの接種物を用いる。用いた微生物は、セルロモナス・セルランス(*Cellomonas cellulans*)(ATCC12830)、エルスコビア・サンシネオリティカ(*Oerskovia xanthineolytica*)(ATCC27402)、プロミクロモノスポラ・シトレ(*Promicromonospora citrea*)(ATCC15908)、サッカロモノスポラ・ビリディス(*Saccharomonospora viridis*)(ATCC15736)、サッカロポリスポラ・ヒルスタ(ATCC27875)、サッカロシリックス・オストラリエンシス(ATCC31497)およびストレプトミセス・ハルステジイ(*Streptomyces halstedii*)(ATCC13449)である。サッカロモノスポラ・ビリディスおよびS.ヒルスタ(ATCC27875)変換フラスコを約280rpm、28℃の振盪器に設置し、他の培養物は約280rpm、25℃の振盪器に設置する。なお、サッカロポリスポラ・ヒルスタ亜種コベンシス(ATCC20501)対照を、25℃と28℃の両方で用いる。

【0040】24時間後、各フラスコに500μg/g用量のコンパクチンを加える。さらに24時間後に、各フラスコに2回目の500μg/g用量のコンパクチンを加える。96時間後、各フラスコから15mlアリコートを取り出し、後のアッセイのため-50℃で凍結する。これらのサンプルを解凍し、アッセイに付す。結果を下記表10および11に示す。

【0041】

30 【表10】

培養物／培地	温度	コバチン	フラバチン	変換率	フラバチン： 副生成物 の比
C. セネンシス /F7	25℃	1107	0	-	-
C. セネンシス /K28	25℃	1072	0	-	-
エンスコF7・チンチナ イタ /F7	25℃	1116	0	-	-
エンスコF7・チンチナ イタ /K28	25℃	688	0	-	-
プロミクロミ/スボラ・ツレ /F7	25℃	1119	0	-	-
プロミクロミ/スボラ・ツレ /K28	25℃	1309	0	-	-
チカロミリス・オスト リエンシス /F7	25℃	63	478	43%	3.1 : 1
チカロミリス・オスト リエンシス /K28	25℃	0	465	42%	4.6 : 1
ストレプトミセス・ハム ステ /F7	25℃	887	0	-	-
ストレプトミセス・ハム ステ /K28	25℃	1114	0	-	-
チカロミリス・オスト (ATCC20501) /F7	25℃	180	532	48%	9.4 : 1

【表11】



培養物／培地	温度	コンパクチン	ブラバスタチン	変換率	ブラバスタチン：副生成物の比
サッカロポリス・ヒルスタ (ATCC20501) /K28	25℃	73	511	46%	9.2 : 1
F7 フラスコ	25℃	1281	0	-	-
K28 フラスコ	25℃	1208	0	-	-
サッカロポリス・ヒルスタ F7	28℃	1213	0	-	-
サッカロポリス・ヒルスタ F7	28℃	1147	0	-	-
サッカロポリス・ヒルスタ (ATCC27875) /F7	28℃	515	92	8%	1.6 : 1
サッカロポリス・ヒルスタ (ATCC27875) /K28	28℃	410	194	18%	2.0 : 1
サッカロポリス・ヒルスタ (ATCC20501) /F7	28℃	35	565	51%	12.8 : 1
サッカロポリス・ヒルスタ (ATCC20501) /K28	28℃	44	520	47%	8.7 : 1

## 【0042】実施例6

8つのATCCムコラレス(Mucorales、ケカビ目)真菌および1つのスタウロホマ(*Staurophoma*)種ATCC 14288を、よく生長した斜面培養から、F4培地の発芽フラスコ(100mlのF4培地/500mlフラスコ)に接種し、25℃のスロー振盪器(約200rpm)に設置する。8つのムコラレス真菌は、アブシディア・ラモサ(*Abundia ramosa*) (ATCC11613)、シルシネラ・ムスカ(*Circinella muscae*) (ATCC16008)、カニングハメラ・エチヌラタ(*Cunninghamella echinulata*) 変異菌エチヌラタ(ATCC36190)、カニングハメラ・エチヌラタ変異菌エレガンス(*elegans*) (ATCC 688A)、ジルベールテラ・ベルシカリヤ(ATCC 38591)、リゾム・ミエヘイ(*Rhizomucor miehe*) (ATCC26912)、リゾプス・オリゴスポラス(*Rhizopus oligosporus*) (ATCC2959)およびリゾプス・ストロニファー(*Rhizopus stolonifer*) (ATCC 14037)である。72時間の振盪後、全ての発芽フラスコ内の生長は、1つの大きな固体真菌集団であるC.エチヌラタ変異菌エチヌラタブイヨンの場合を除き、良好である。この真菌集団を捨てる。残りの7つのムコラレスフラスコ、および1つのスタウロホマフラスコをそれぞれ用い、F7培地およびK28培地の生変換

フラスコ(250mlフラスコ当り50ml培地を含有)に接種する。フラスコ1つに、2mlの接種物を用いる。全てのフラスコを25℃の一定スピード(約280rpm)振盪器に設置する。

【0043】24時間後、2つの非接種フラスコ、F7培地およびK28培地の各1つを含む、全てのフラスコに、500μg/ml用量のコンパクチンを入れる。全てのフラスコを、280rpm、25℃の振盪器へ戻す。さらに24時間後、全てのフラスコに2回目の500μg/ml用量のコンパクチンを入れ、次いで振盪器へ戻す。さらに48時間後、各フラスコから15~20mlのサンプルを取り、アッセイに付す。結果は、以下の通りである。ジルベールテラ・ベルシカリヤF7-コンパクチン621μg/g; ブラバスタチン274μg/g; ブラバスタチン: 副生物の比2.3:1; およびK28-コンパクチン822μg/g; ブラバスタチン54μg/g; ブラバスタチン: 副生物の比3.4:1。他の培養物の2つは、せいぜい、痕跡量のブラバスタチンが認められる(アブシディアおよびリゾプス・オリゴスポラス)。他の全てはブラバスタチンに対して陰性であった。

## 【0044】実施例7

F4培地中2日、3日および4日経過したサッカロポリス・ヒルスタ亜種コペンシス(ATCC20501)

接種物を用い(100mlのF4培地/500mlフラスコ、それぞれ凍結バイアルで接種)、K28培地の生変換フラスコ(50mlのK28/250mlフラスコ)に接種する。5mlの接種物を用い、各発芽フラスコから3つのK28培地フラスコに接種する。3日経過の発芽フラスコの接種物を用い、異なる容量の接種物で3回K28培地フラスコに接種する。詳しくは、0.25ml、1.0ml、2.5ml、7.5mlおよび10ml容量を用いた。全て \*

\*のフラスコを約280rpm、28℃の振盪器に設置する。24時間後、各フラスコに500μg/ml用量のコンパクチンナトリウム塩を加える。さらに24時間後に、各フラスコに1000μg/ml用量のコンパクチンナトリウムを加える。48時間後に、25のフラスコの培養物を回収し、アッセイに付す。結果は、下記表12の通りである。

【表12】

接種物の 加齢	接種物の 容量(X)	コンパクチン μg/g (3回の平均)	フラバチン μg/g (3回の平均)	変換率
48時間	5 ml (10%)	痕跡	597	40%
72時間	0.25 ml (0.5%)	1084	138	9%
72時間	1 ml (2%)	901	211	14%
72時間	2.5 ml (5%)	224 *	692	46%
72時間	5 ml (10%)	痕跡 **	676 **	45%
72時間	7.5 ml (15%)	10	609	41%
72時間	10 ml (20%)	痕跡	694	46%
96時間	5 ml (10%)	痕跡	700	47%
なし	-	1201	0	-

注\*) 672 μg/gコンパクチンの1つのフラスコと、痕跡量を示す2つのフラスコを平均した結果

※\*\*) 2つのフラスコの平均; 汚染の可能性のある3つのフラスコは無視

フロントページの続き

(51)Int.Cl.6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12P 7/40

C12R 1:01)

(C12P 7/40

C12R 1:645)

(72)発明者 ボール・エム・チノ

アメリカ合衆国ニュージャージー州バウンド・ブルック、クレスト・ドライブ4番

(72)発明者 ラズロ・ザルカ

アメリカ合衆国ニュージャージー州イースト・ブランズウィック、ウェリントン・ロード5番